



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001061470 A**(43) Date of publication of application: **13.03.01**

(51) Int. Cl.

C12N 5/06
A01K 67/02
C12N 1/00
C12N 15/00(21) Application number: **11242763**(22) Date of filing: **30.08.99**(71) Applicant: **SCIENCE & TECH AGENCY**(72) Inventor: **AZUMA SADAHIRO**
YOKOYAMA MINESUKE(54) **MOUSE EMBRYONIC STEM CELL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new cells, female mouse embryonic stem cells, isolated from general-purpose inbred line C51BL mouse strain, having chimera-forming ability, differentiable into productive cells, and useful for e.g. creating chimeral individuals by injection method or aggregation method.

SOLUTION: The new cells are female mouse embryonic stem cells [e.g. H14-2-1 strain (FERM P-17534)] which are isolated from general-purpose inbred line C57BL

mouse strain, have chimera-forming ability, and are differentiable into productive cells, therefore being useful for e.g. creating chimeral individuals by injection method or aggregation method. The new mouse embryonic stem cells are obtained by the following practice: mouse embryonic cells incubated in vitro from the transparent zone of general-purpose inbred line C57BL/6N strain female mouse are collected from mouse litter, sprinkled with fibroblast as feeder cells prevented from division with mitomycin C to proliferate internal cell aggregation.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-61470
(P2001-61470A)

(43)公開日 平成13年 3月13日 (2001.3.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 6 5
A 0 1 K 67/02		A 0 1 K 67/02	
C 1 2 N 1/00		C 1 2 N 1/00	U
15/00		15/00	Z

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平11-242763

(22)出願日 平成11年 8月30日 (1999.8.30)

(71)出願人 592146265
科学技術庁長官官房会計課長
東京都千代田区霞が関二丁目 2 番 1 号
(72)発明者 東 貞宏
東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内
(72)発明者 横山 峯介
東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化
学生命科学研究所内
(74)代理人 100096219
弁理士 今村 正純 (外 3 名)
Fターム(参考) 4B065 AA91X AC20 BB34 BC31
BD50 CA43 CA46

(54)【発明の名称】 マウス胚性幹細胞

(57)【要約】

【課題】 汎用近交系マウスからキメラ形成能および生殖細胞への分化能力を有し、インジェクション法及びアグリゲーション法によるキメラ個体の作出に使用できる、雌のES細胞を樹立する。

【解決手段】 C 5 7 B L / 6 N系雌マウスの透明帯からイン・ビトロで孵化させた孵化胚盤胞をフィーダー細胞上で培養し、分離したICMを培養し、イン・ビトロで継代維持が可能なES細胞を分離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 汎用近交系C57BLマウス系統から分離され、キメラ形成能および生殖細胞への分化能力を有する、雌の胚性幹細胞。

【請求項2】 寄託番号FERM P-17534として寄託されているH14-2-1株である請求項1に記載の胚性幹細胞。

【請求項3】 イン・ビトロで透明帯から孵化させた胚盤胞を使用して、胚性幹細胞株を樹立させることを特徴とする請求項1または2に記載の胚性幹細胞の樹立法。

【請求項4】 透明帯から孵化させた孵化胚盤胞を、胎仔より採取し、マイトマイシンCにより分裂を抑制した線維芽細胞をフィーダー細胞として、この上に播き、内部細胞塊を増殖させることを特徴とする請求項3に記載の胚性幹細胞の樹立法。

【請求項5】 インジェクション法またはアグリゲーション法によるキメラ個体作成のための請求項1または2に記載の胚性幹細胞の使用。

【請求項6】 BALB/c系マウス胚を受容体としてキメラ個体を作成する請求項5に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、C57BLマウス系統から分離された雌の胚性幹細胞(ES細胞)に関するものである。本発明のES細胞は、インジェクション(注入)法およびアグリゲーション(集合)法によるキメラ個体の作成に使用される。

【0002】

【従来の技術】胚性幹(Embryonic Stem, ES)細胞は初期胚から分離された全能性を持つ細胞株である。このES細胞は正常な胚とキメラ胚を形成させることにより、成体のあらゆる成熟細胞へと分化する能力を保有しながら培養維持が可能な細胞である。また、ES細胞はイン・ビトロの分化誘導条件によっても様々な細胞を生成させる能力をもっている。マウス個体を構成する細胞は胚盤胞期の内部細胞塊(Inner Cell Mass, ICM)あるいは外胚葉(epiblast、エピブラスト)から派生した一次外胚葉に由来している。その意味ではICMおよびエピブラストは全能性を持った幹細胞群であるといえる。このICMから未分化状態を維持したまま培養分離されるのが胚性幹(Embryonic Stem, ES)細胞である。

【0003】このES細胞は形態的には胚性癌(Embryonal Carcinoma, EC)細胞と類似しているが、イン・ビオおよびイン・ビトロでの分化能は高く、初期胚とキメラ胚を形成させることにより、正常な胎仔発生に貢献し、成体のあらゆる臓器にES細胞由来の成熟細胞が検出されることから、全能性の幹細胞と見なされている。ES細胞を未分化状態で維持するには白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)存在下にゼラチンコートしたプレート上で、あるいは胎仔由来の線維芽細胞をフィーダー

細胞として培養することが必要である。この条件下では遺伝子導入およびクローン化が可能であり、遺伝子改変動物の作製において有力な手法として知られている。

【0004】一方、培養系を操作することにより、ES細胞から血球系、心筋、骨格筋、神経など多数の細胞群へ分化させることが可能である。ES細胞は、塊(胚様体)を形成して三次元的に増殖し、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉を構成しながら各成熟細胞へと分化することから、囊胚期の胚の発生過程を再現していると見られている。しかも、培養細胞であることからスケールアップが容易であり、ICMおよびエピブラストから発生してくる様々な系列の前駆細胞を多数単離するのに非常に都合が良い。したがって、ES細胞は、このような細胞の発生過程に必要な液性因子のスクリーニングや遺伝子機能の検討に威力を発揮する哺乳動物では唯一の実験系である。

【0005】現在までに雌のES細胞でキメラ形成能が確認されているものは、Evans等(“Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo”(初期哺乳類胚における遺伝子操作) ConstantiniおよびJaenisch編集。コールド・スプリング・ハーバー・ニューヨーク発行、1985年)によって129系統マウスから樹立された細胞株2例と単為発生2倍体化胚より樹立された129系統マウス由来の細胞株2例、CBAとC57BL系統マウス間のF1の単為発生胚に由来する2例の細胞株に限られている。さらに、汎用近交系C57BLマウス由来の細胞株で生殖細胞への分化能力を維持しているものは、LedermanおよびBurki(Experimental Cell Research (エクスペリメンタル・セル・リサーチ) 197, 254-258, 1991)により得られた雄の1株(BL-III)にすぎない。また、その他の近交系であるDBA(Experimental Cell Research (エクスペリメンタル・セル・リサーチ) 221, 520-525, 1995)からも生殖細胞への分化能力を保持したES細胞が樹立されているが、この株もやはり雄の細胞株1株である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】現在使用されているES細胞の殆ど全ては生殖細胞からテラトーマ(奇形腫)、いわゆる胚性癌細胞(teratocarcinoma)を高率に形成する系統として確立された系統である129系マウスに由来する細胞である。汎用近交系から樹立されキメラ形成能および生殖細胞への分化能力を持っている雌のES細胞は存在しない。そのため、従来公知のES細胞は、雌特異的な遺伝子改変実験には適しておらず、さらにES細胞を体外で様々な組織に分化させ組織を個体へ移植しようとした場合、拒絶反応を抑える免疫抑制剤投与による障害を排除するためには雄個体のみへ移植することとなる。そこで、一般的なマウス系統でしかも免疫系の研究の蓄積が多く存在する汎用近交系C57BL系マウスから雌のES細胞の樹立が望まれている。

【0007】

【課題を解決するための手段】汎用近交系C57BL系マウスからのES細胞を樹立すべく試みたところ、キメラ形成能および生殖細胞への分化能力を有し、雌特異的な遺伝子改変実験あるいは免疫抑制剤の障害を排除した組織移植実験に大きく貢献する雌のES細胞H14-2-1株の樹立にはじめて成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、透明帯から脱出した孵化胚盤胞をES細胞の樹立に使用すると効率的にES細胞を樹立できること、イン・ビボで孵化させた場合、胚盤胞の回収率が低下するので、C57BL系統由来の胚盤胞をイン・ビトロで培養することにより、透明帯から脱出させた孵化胚盤胞を作成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 汎用近交系C57BLマウス系統から分離され、キメラ形成能および生殖細胞への分化能力を有する、雌の胚性幹細胞。

(2) 寄託番号FERM P-17534として寄託されているH14-2-1株である1項に記載の胚性幹細胞。

(3) イン・ビトロで透明帯から孵化させた胚盤胞を使用して、胚性幹細胞株を樹立させる1項または2項に記載の胚性幹細胞の樹立法。

(4) 透明帯から孵化させた孵化胚盤胞を、胎仔より採取し、マイトマイシンCにより分裂を抑制した線維芽細胞をフィーダー細胞として、この上に播き、内部細胞塊を増殖させる3項に記載の胚性幹細胞の樹立法。

(5) インジェクション法またはアグリゲーション法によるキメラ個体作成のための1項1または2項に記載の胚性幹細胞の使用。

(6) BALB/c系マウス胚を受容体としてキメラ個体を作成する5項に記載の使用。

【0009】

【発明の実施の形態】汎用近交系C57BLマウスから樹立され、キメラ形成能および生殖細胞への分化能力を有する、本発明の雌の胚性幹細胞(ES細胞)は、桑実胚期までの初期胚に細胞を接着させて集合させるアグリゲーション(集合)法および胚盤胞の胞胚腔内へ細胞を注入するインジェクション(注入)法によりキメラ個体を作成するのに使用される。本発明のES細胞を使用し、BALB/c系マウス胚を受容体(宿主胚)としてキメラ個体を作成するとES細胞の寄与度の高いキメラ個体が得られる。

【0010】ES細胞株を樹立するには、通常胚盤胞の内部細胞塊の細胞を使用して培養を開始する。桑実胚の解離細胞や着床を遅らせた胚盤胞も使用できる。しかしながら、これらの胚細胞は、直ちに上皮様細胞等に分化するので、STO細胞株やマウス胎仔から調製した初代線維芽細胞を使用したフィーダー細胞層の上で、適当な細胞密度を保ちつつ、培養液を頻繁に交換しながら、細胞の解離と継代を繰り返すことにより、未分化幹細胞の性質を保持した細胞を維持できる。

【0011】ES細胞の樹立に使用される標準的な方法は、Evans et al.、Nature、292、154-156(1981); Martin et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、Vol. 78、7634-7638(1981)およびRobertson, E. J.、Embryonic stem cells (胚由来幹細胞)、IRL Press Ltd, Oxford (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach. (奇形腫細胞および胚性幹細胞、実的なアプローチ)に記載されている。ES細胞の樹立には、10%FCS添加のウィットン培地で孵化させた胚を用いる方が、樹立効率が高い傾向にある。したがって、本発明のES細胞は、胚盤胞をイン・ビトロで孵化させて使用するのが好ましい。すなわち、イン・ビボで孵化させた場合には、胚盤胞の回収率が低下するので、C57BL系統由来の胚盤胞は、イン・ビトロで培養して、透明帯から脱出させた孵化胚盤胞をES細胞の樹立に使用するのが好ましい。

【0012】本発明のES細胞は、以下のようにして作成される。まず、C57BL/6N系マウス雌10匹について、交配後3.5日の子宮より36個の胚盤胞を採取し、16個の胚盤胞は採取直後にフィーダー細胞上に播き、残りの20個についてはFCS(牛胎児血清)を10%になるように添加したウィットン(Whitten)培地で一晚培養して透明帯から孵化させた孵化胚盤胞をフィーダー細胞上に播いた。フィーダー細胞は妊娠15.5日目の胎仔より線維芽細胞を採取し、マイトマイシンCにより分裂抑制を施して使用した。その結果、胚盤胞、孵化胚盤胞共に全ての胚でICM(内部細胞塊)の増殖が確認された。また、孵化胚盤胞由来ICMは胚盤胞由来のものに比べて増殖速度が速く、さらに大きなICMの塊を形成して目立った分化像を示さなかったが、胚盤胞由来のICMの場合ICM塊が小さな状態でも分化像を呈するものが多く認められた。最終的に6株の孵化胚盤胞に由来するES細胞株の樹立に成功した。

【0013】得られたES細胞株について染色体検査を行ったところ、胚盤胞の由来にかかわらず、全てのES細胞株において、正2倍体(40本)の染色体を有することが確認された。また、同時に実施した浮遊培養によるイン・ビトロでの分化試験の結果、胚様体を形成し、培養5日目には原始外胚葉と原始内胚葉様組織を構成した。さらに、これら二胚葉を構成した時点で、三次元的な浮遊培養を継続するものと二次元的に接着培養するものとに分けて培養を継続した。その結果、三次元的に培養したものでは赤血球が形成され、胚葉体が赤く染まり、自立的に拍動する心筋細胞の分化が確認された。また、二次元的に培養した胚葉体はシート状に広がり、心筋、骨格筋、神経、上皮系、血管構造を作り出すのが

観察された。このように、イン・ビトロで胚盤胞を透明帯から脱出させることにより、高率でC57BL由来の胚からES細胞株の樹立に成功した。さらに、得られたES細胞を三次元的に分化誘導することにより赤血球細胞の生成が確認された。

【0014】得られた6株のうち1株についてインジェクション法とアグリゲーション法によりキメラマウスを作製し、ES細胞由来の産仔を確認した。インジェクション法とアグリゲーション法とを比較すると、インジェクション法は、宿主胚として宿主胚自身のICMが存在する胚盤胞を使用するので、個体への発生率、キメラ産仔の出現率がアグリゲーション法に比べて高い傾向にあ*

*る。しかし、1回に処理できる数が限られる。一方、アグリゲーション法の場合は、大量の胚を1回で処理できるので、キメラ産仔の出現率が低くても、使用する価値がある。いずれの方法を使用するかは、ES細胞の性質により決定される。

【0015】

【実施例】以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例によって制限されるものではない。

【0016】実施例1

使用した培地の組成およびその作成法は、以下のとおりである

ES細胞培養用培地 (Stem Cell Medium, SCM)

SCMの組成(100ml)

80ml DMEM高グルコース

20ml FCS

1ml 2-メルカプトエタノール ストック⁽¹⁾

1ml 非必須アミノ酸 (Gibco Cat. No. 320-1140PG)

1ml ヌクレオシド ストック⁽²⁾

(1) 2-メルカプトエタノール ストック: 10ml のPBS に7 μ l

の2-メルカプトエタノールを溶解する。

(2) ヌクレオシド ストック:

アデノシン 80mg

グアノシン 85mg

シチジン 73mg

ウリジン 73mg

チミジン 24mg

を100mlのmilli Q水に添加して37℃に温めながら溶解し、6mlずつ分注して-20℃で保存し、添加するときは、37℃に温めて完全に溶解してからDMEMに加える。非必須アミノ酸も同様に保存して、添加する。

【0017】リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

10.0g NaCl

※0.25g KCl

1.44g Na₂HPO₄ · 12H₂O

0.25g KH₂PO₄

1000mlのMilli Qに溶解してpHを7.2に調整し、500mlずつに分注後オートクレーブする。

※ 【0018】

トリプシン-EDTA (T-E)

2.5g トリプシン (Porcine Sigma Cat. No. T-0646)

0.4g EDTA

7.0g NaCl

0.3g Na₂HPO₄ · 12H₂O

0.24g KH₂PO₄

0.37g KCl

1.0g D-グルコース

3.0g Tris

1.0ml フェノールレッド (Gibco. 0.5%)

1000mlに溶解してpH7.6に調整する。0.22 μ m フィルターで濾過滅菌後10mlずつ分注して-20℃で保存する。

【0019】凍結培地

DMEM, 20% (v/v) FCS, 10% (v/v)

DMSO

ウィットテン (Whitten) 培地 (100ml)

514mg

NaCl

36mg

KCl

16mg

KH₂PO₄

53mg

乳酸Ca-5H₂O

29mg

MgSO₄ · 7H₂O

190mg

NaHCO₃

100mg

グルコース

7

0.37ml 60%乳酸Na
3.5mg ビルビン酸Na
300mg BSA (ウシ血清アルブミン)
8mg ペニシリン
5mg ストレプトマイシン

を、100ml MilliQ水に溶解後、0.22 μ m フィルターで濾過する。ウイッテン (Whitten) 培地-Hepesは、上記ウイッテン培地のNaHCO₃を22mgに減量し、代わりにHepes 477.6mgを入れ、HClでpHを7.2に調整して得られる。

【0020】(1) 胚の回収

C57BL/6N系マウスの発情雌を外陰部の兆候から10匹選び出し、夕方(16時~17時)に雄のケージに入れ、翌朝8匹の個体に膣栓を確認し、これを集めた。3日後(受精から3.5日後)これらの雌個体から子宮を取り出し、ウイッテン培地-Hepes (Whitten Medium-Hepes) (組成は培地組成の項参照)で胚を洗い流した。ここで36個の胚盤胞を得た。

【0021】(2) 胚盤胞の孵化

得られた胚盤胞を60mmディッシュ中にミネラルオイルで覆ったウイッテン培地-10%FCS 0.2mlの小滴を作り、その小滴中で1晩培養し、透明帯から孵化させた。

【0022】(3) 孵化胚盤胞の培養

孵化胚盤胞を、あらかじめフィーダー細胞層を形成させた4ウェルプレートに1個ずつ入れSCM-20%FCS (組成は培地組成の項参照) 1ml中で培養した。フィーダー細胞に栄養外胚葉 (Trophoblast) が接着して内部細胞塊 (Inner Cell Mass; ICM) が増殖を始めた時点 (3日~4日培養後) で、ICMが増殖していて、かつそれが目立った分化が認められないウェルについて、培地をPBS (培地の項参照) 1mlに置き換えた。

【0023】なお、フィーダー細胞は、以下のようにして作成した。まず、コンフルエントの100mlディッシュにマイトマイシンCを5ml添加し、2.5時間処理して分裂抑制をかけ、次いで培地を除き、5ml PBSで5回洗浄し、MMCを完全に除く。さらに、T-E処理により、細胞を剥がし、遠心して上清を除く。10ml DMEMに再懸濁して、 3×10^5 /mlに調節して1、3、5、60mmプレート当たり各々0.5、1、2mlずつ播く。なお、フィーダー細胞は、使用前の日に作成する。その使用期間は、MMC処理後7日以内とする。

【0024】(4) ICMの分離

PBSに置き換えたウェルからICMを、ガラス毛细管を用いて吸引し、フィーダー細胞と分離採取した。これをミネラルオイルで覆った20 μ lのT-E緩衝液 (組成は培地の項参照) 中に加え、細胞がばらばらになった

8

ら (3分~5分)、SCM20 μ lを添加しトリプシンの作用を止めた。このICMを先端の直径100~200 μ mのガラス毛细管 (自家製) を用いて吸引、吹き出しを繰り返すことによりICMを10個くらいの細胞塊に分離した。

【0025】

【0026】(5) ICMの培養

上記のようにして、ばらばらにしたICMを、SCM1mlを入れた4ウェルプレートで7日~10日 (ウェルによって増殖の仕方が違うので培養時間は異なった) 培養し、ES細胞様の細胞が増殖し、かつそれが目立った分化を起こさないまま直径200 μ m以上になったことを確認した。

【0027】(6) ES様細胞の分離

上記のようにしてES様であることを確認した細胞は、ガラス毛细管で吸い上げ、これをミネラルオイルで覆った20 μ lのT-E溶液 (組成は培地の項参照) に加え、細胞がばらばらになったら (3分~5分) SCM20 μ lを添加してトリプシンの作用を止めた。このES様細胞を含んだ液を100~200 μ mのガラス毛细管 (自家製) を用いて吸引、吹き出しを繰り返すことにより完全に1個の細胞に分離した。このようにしてC57BL系統から分離された雌のES細胞H14-2-1株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-17534として寄託されている (寄託日: 平成11年8月26日)。

【0028】(7) ES細胞の凍結、融解

60mmのディッシュにコンフルエントに増殖した上記のES細胞をT-E溶液で剥して1500r.p.mで5分間、遠心して細胞を集め、冷やしておいた凍結培地 (Freezing medium) 1mlに懸濁して1.8ml クライオチューブに入れ、凍結ボックス (freezing box) に納めて-80℃に一晚、その後液体窒素中で保存する。凍結したES細胞は使用する都度融解する。凍結バイアル (Freezing vial) を30℃の微温湯で融解し、10mlのDMEMに懸濁して1500r.p.mで5分間遠心して細胞を集め、これをSCM4mlに再懸濁して60mmディッシュ中でコンフルエントになるまで培養する。

【0029】(8) ES細胞の培養

凍結しておいたES細胞を融解し、60mmのフィーダー細胞層の存在するディッシュにまき、細胞がコンフルエントになったディッシュはSCMを捨て、5mlのPBSで洗い、1mlのT-E溶液で2~3分処理した。T-E溶液で処理したディッシュに1mlのSCMを加えトリプシンの反応を中和し、先端を炎で焼いて滑らかにしたパスツールピペットで単一の細胞になるまでピペティングした。次に1500r.p.mで遠心して細胞を集め、5~10mlのSCMに再懸濁して5~10枚のフィーダー細胞層の存在するディッシュにまきかえる。このような継代作業を繰り返して未分化状態を維持し

たまま培養できることを確認した。

【0030】なお、ES細胞は、非常に良く増殖する細胞なので、培地交換を毎日行う必要があり、pHを酸性にしたままにすると分化する。また、ES細胞は、凝集が分化シグナルになるので、継代のときに完全に単一にする最初の段階では、ピペッティング後顕微鏡で凝集を確認するのが好ましい。さらに、継代のときの細胞数を一定にしないと分化が起こる。

【0031】(9) キメラマウスの作出（注入法；インジェクション法）

標準的な方法は、文献（Robertson, E. J., Embryo-derived stem cells., IRL Press Ltd, Oxford (1987) Terarocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach.）に記載されており、以下に記載の方法はこれに則して行った。

【0032】インジェクションピペット（Drummond社製；100 disposable micro-pipet）に10個～15個のES細胞を吸引し、そのインジェクションピペットを差込んで、6～12週齢のBALB/c系雌マウスから得た胚盤胞の胞胚腔内にES細胞を注入した。ES細胞の注入は23個の胚盤胞について行い、それらの胚盤胞を60mmディッシュ中にミネラルオイルで覆ったウイッテン培地-20% FCS 0.2mlの小滴を作り、その小滴中で1時間培養し、再び胞胚腔を形成させた。この胚を11～12個ずつ、偽妊娠2.5日目のICR系マウス、計2匹の受容雌子宮角に移植した。

*

BALB/c	宿主株胚	転移した胚の数	生存新仔の数(%)	キメラマウスの数(%)	交配キメラ数	生殖細胞キメラマウス数
アグリゲーション法	ICR	117	50(42.7)	15(12.8)	♂ 3 ♀ 12	0 3
	BALB/c	28	6(21.4)	5(17.9)		
インジェクション法	BALB/c	23	21(91.3)	6(26.1)	♂ 4 ♀ 2	0 2

【0037】

【発明の効果】透明帯から孵化させた、汎用近交系であるC57BL/6N系マウスの孵化胚盤胞を、マイトマイシンCにより分裂抑制したフィーダー細胞で培養し、次いで増殖したICMを培養して得られるES細胞は、キメラ形成能および生殖細胞系への分化能力を有し、雌特異的な遺伝子改変実験あるいは免疫抑制剤の障害を排

*【0033】(10) キメラマウスの作出（集合法；アグリゲーション法）

標準的な方法は文献（Nagy, A. and Rossant, J. (1993) Production of completely ES cell-derived fetuses. In Gene Targeting: A Practical Approach (ed. A.L. Joyner). IRL Press, Oxford）に記載されており、以下に記載の方法はこれに則して行った。

【0034】60mmディッシュにダーニングニードル（Cat. No. DN-09; Biochemical Laboratory Service Ltd.

製）を用いてくぼみを作製した。このくぼみにES細胞1～20個を入れ、その上にかぶさるようにICR、BALB/c系雌マウスから採取し、あらかじめ酸性タイロド溶液（Sigma社 Cat. No. T1788）で透明体を除去した後、ウイッテン培地+10% FCSでpHを中和した8細胞期胚1個を入れた。これを1晩培養し、胞胚腔が開き始めたところでICR系偽妊娠2.5日雌マウス合計12匹の子宮角に移植した。

【0035】(11) ES細胞の生殖細胞への分化の確認

(9)(10)で作製したキメラマウスを、BALB/c系マウス（アルビノ様）と交配し、その産仔を生後3週間目で毛色の表現型を観察した。アルビノの個体は受容胚由来の産仔で、有色の個体はES細胞由来の産仔である。最終的な結果を以下の表1に示した。

【0036】

【表1】

除した組織移植実験に使用できる。本発明のES細胞は、インジェクション法及びアグリゲーション法による2種類のキメラ作出法のどちらを使用してもキメラ個体を得られる。また、BALB/c系マウス胚を受容体としてキメラ個体を作成すると、ES細胞の寄与度の高いキメラ個体を得られる。